

09/914,152<sub>72</sub>

012416278

WPI Acc No: 1999-222386/199919

A glycosyltransferase gene - having beta1,3-galactosyltransferase activity

Patent Assignee: FURUKAWA K (FURU-I)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 11056373	A	19990302	JP 97246176	A	19970827	199919 B

Priority Applications (No Type Date): JP 97246176 A 19970827

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 11056373	A	14	C12N-015/09		

Abstract (Basic): JP 11056373 A

A glycosyltransferase gene having beta1,3-galactosyltransferase activity and containing the amino acid sequence from the 26th Ser to the 371st Ser in the amino acid sequence (I), a fully defined 371 amino acid protein given in the specification, or (I) with at least one amino acid deleted, replaced or added.

Also claimed are: (1) a glycosyltransferase gene having

beta1,3-galactosyltransferase activity and containing the amino acid sequence from the 1st Met to the 371st Ser of (I), or (I) with at least one amino acid deleted, replaced or added; (2) a polynucleotide coding the above glycosyltransferase; (3) a polynucleotide having the base sequence from the 270th T to the 1307th T in the base sequence of (II), a fully defined 1613 bp DNA given in the specification; (4) a polynucleotide having the base sequence from the 195th A to the 1307th T of (II); and (5) a polynucleotide coding a protein hybridizing with the base sequence of (II) and having beta1,3-galactosyltransferase activity.

USE - None given.

ADVANTAGE - The invention shows an identity of GD1/GM1/GA1 synthase gene.

Dwg. 0/8

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12N-015/09

International Patent Class (Additional): A61K-038/45; C12N-009/10;

C12R-001-91

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平 1 1 - 5 6 3 7 3

(43)公開日 平成11年(1999)3月2日

(51)Int. Cl.<sup>6</sup>  
C 1 2 N 15/09  
9/10  
// A 6 1 K 38/45  
( C 1 2 N 9/10  
C 1 2 R 1:91 )

識別記号

Z N A

A A B

F I

C 1 2 N 15/00 Z N A A

9/10

A 6 1 K 37/52 A A B

審査請求 未請求 請求項の数 6

F D

(全 1 4 頁)

(21)出願番号 特願平9-246176

(22)出願日 平成9年(1997)8月27日

(71)出願人 597130236

古川 鋼一

愛知県名古屋市北区名城3丁目1-5 名城  
住宅5-402

(72)発明者 宮崎 宏

愛知県名古屋市昭和区狭間町25 S A N O  
-6 202号

(72)発明者 福本 敏

愛知県名古屋市千種区吹上1-2-27 山下  
ビル302号

(72)発明者 岡田 雅彦

長崎県西彼杵郡長与町嬉里郷1093-5-401

(74)代理人 弁理士 長谷川 芳樹 (外5名)

最終頁に続く

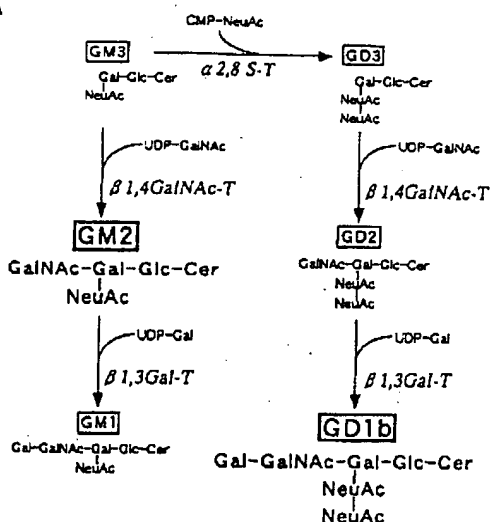
(54)【発明の名称】糖転移酵素遺伝子

(57)【要約】

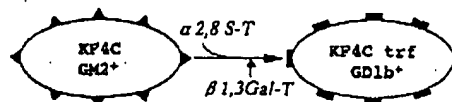
【課題】 本発明は、新規糖転移酵素及びそれをコードする遺伝子を提供する。

【解決手段】 本発明は、新規糖転移酵素である $\beta$ 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ(EC 2.4.1.-)( $\beta$ 1,3Ga—1-T)のアミノ酸配列、及びそれをコードする遺伝子の塩基配列を見出した。

A



B



## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列のうち 2 6 位の Ser から 3 7 1 位の Ser までのアミノ酸配列、又は前記アミノ酸配列に対して 1 以上のアミノ酸の欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を含んでなる、 $\beta$ 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ活性を有する糖転移酵素。

【請求項 2】 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列のうち 1 位の Met から 3 7 1 位の Ser までのアミノ酸配列、又は前記アミノ酸配列に対して 1 以上のアミノ酸の欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を含んでなる、 $\beta$ 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ活性を有する糖転移酵素。

【請求項 3】 請求項 1 または 2 に記載の糖転移酵素をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 4】 配列表の配列番号 2 に記載の塩基配列のうち 2 7 0 位の T から 1 3 0 7 位の T までの塩基配列を有するポリヌクレオチド。

【請求項 5】 配列表の配列番号 2 に記載の塩基配列のうち 1 9 5 位の A から 1 3 0 7 位の T までの塩基配列を有するポリヌクレオチド。

【請求項 6】 配列表の配列番号 2 に記載の塩基配列とハイブリダイズし、かつ  $\beta$ 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、糖転移酵素及びそれをコードする遺伝子に関する。

## 【0002】

【従来の技術】ガングリオシドは、シアル酸を含む両親媒性糖脂質分子であり、脊椎動物の神経組織 (Suzuki, K. (1965) J. Neurochem. 12, 969-979) に豊富に見出される。すでにガングリオシドについては多くの研究がなされており、それらが神経系の発達、維持、及び修復において重要な役割を果たしていること (Schaal, H., Wille, C., and Wille, W. (1985) J. Neurochem. 45, 44-551)、ガングリオシドの生物学的機能は神経栄養因子 (Ferrari, G., Anderson, B. L., Stephens, R. M., Kaplan, D. R., and Greene, L. A. (1995) J. Biol. Chem. 270, 3074-3080)、神経栄養因子のレセプター及び、成長因子のレセプターのモディファイヤー (Modifiers) Bremer, E. G., Hakomori, S., Bowen-Pope, D. F., Raines, E., and ROSS, R. (1984) J. Biol. Chem. 259, 6818-6825) であること等が知られている。さらに、体内へガングリオシドを全身的に投与すると、種々の病理的条件において神経栄養性効果を示すことも知られている。

【0003】一方、ガングリオシドが神経系の機能に影響し、細胞成長と分化を制御する分子メカニズムにつ

てはいまだ明らかでない。従来は、培養細胞、又は実験動物にガングリオシドを外因的に添加してその効果を観察する方法のみがなされていた。これらの問題は、いくつかのグリコシルトランスフェラーゼ遺伝子が単離 (Joziasse, D. H., Shaper, J. H., Van den Eijnden, D. H., VanTunen, A. J., and Shaper, N. L. (1989) J. Biol. Chem. 264, 14290-14297, Narimatsu, H., Sinha, S., Brew, K., Okayama, H., and Qasba, P. K. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 4720-4724) され、それらの遺伝子操作により細胞の糖化の型を改変することが可能となり著明に解決されてきた (Ikematsu, S., Kaname, T., Ozawa, M., Yonezawa, S., Sato, E., Uehara, F., Obama, H., Yamamura, K., and Muramatsu, T. (1993) Glycobiology. 3, 575-580, Ioffe, E., and Stanley, P. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 728-732, Metzler, M., Gertz, A., Sarkar, M., Schachter, H., Schrader, J. W., and Marth, J. D. (1994) EMBO J. 13, 2056-2065)。例えば、培養細胞において炭水化物をリモデルし、実験動物において炭水化物を遺伝子的に修飾することが試みられ (Takamiya, K., Yamamoto, A., Furukawa, K., Yamashiro, S., Shin, M., Okada, M., Fukumoto, S., Haraguchi, M., Takeda, N., Fujimura, K., Sakae, M., Kishikawa, M., Shiku, H., Furukawa, K., and Aizawa, S. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 10662-10667)、予想されなかった又は明確には知られていなかった炭水化物の新規な機能が見出された。

【0004】複合型ガングリオシドのうち、GM1 は最も研究されているものであり、脊椎動物の脳に存在する主なガングリオシドである。GM1 はまた、コレラトキシン B サブユニットと特異的に結合して cAMP 応答 (Holmgren, J., Lonnroth, I., Mansson, J. E., and Svennerholm, L. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 2520-2524) のような重要な生物学的現象をもたらすことが知られている。さらに、GM1 は FSH 及び LH のようなペプチドホルモンのレセプター機能に関与していること、及び神経系の多くの病理的状況に対する治療応用に効果的であるということも知られている。

【0005】しかしながら、複合型ガングリオシドの生理学的機能についての詳細な分析にとって、個々の構造の合成にあずかるグリコシルトランスフェラーゼの遺伝子についていまだ利用可能となっていないという問題があった。

## 【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明者等は、以上の問題に鑑み鋭意研究し、複合型ガングリオシドの生理学的機能の詳細な分析のために、個々の構造の合成にあずかるグリコシルトランスフェラーゼの遺伝子を利用可能とすることに成功したものである。すなわち、本発明者等は、 $\beta$ 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ (EC 2.4.

1.-)( $\beta$ 1,3Gal-T)遺伝子であって、その産物がGD1bの発現を決定するようなcDNAクローンの単離に成功した。さらに、該cDNAを適当なプレカーサー構造を有する種々の細胞系に導入することにより、また、該cDNA遺伝子を導入された細胞からの抽出液を用いたインビトロアッセイから、該酵素が、GM1及びアシアロ-GM1(GA1)の合成を触媒することを見出した。また、該酵素のラット組織間、及びラット脳における遺伝子の発現パターンについても重要な知見を得、係る知見に基づき本発明を完成するに至った。

#### 【0007】

【課題を解決するための手段】すなわち、本発明においては、抗GD1bモノクローナル抗体を用いて、 $\beta$ 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子( $\beta$ 1,3-galactosyl transferase gene) (EC 2.4.1.62)のcDNAの発現クローニングを行うものである。このため、ポリオーマT抗原遺伝子とGM2/GD2シンターゼcDNAを用いて遺伝子導入されたマウスメラノーマ株B16であるKF4Cが、cDNAライブラリー遺伝子導入のための受容細胞株として使用される。また、GD3シンターゼのcDNAクローンであるpD3T-31は、ラット脳RNAとpcDNA1発現ベクターを用いて調製したcDNAライブラリーと共に共-遺伝子導入(co-transfection, co-transfection)する。

【0008】さらに、本発明によれば、単離されたcDNAクローンpM1T-9は、その遺伝子産物がサイトプラスミクドメインの4アミノ酸、トランスメンブレンドメインの21アミノ酸、及び大きな触媒ドメイン(catalytic domain)の346アミノ酸を有するタイプIIの膜タンパク質であることを示唆するものである。

【0009】また、本発明において、GM2/GD2シンターゼ遺伝子を導入したマウスメラノーマ株B16に該cDNAを導入することにより、GM1の新合成(neo-synthesis)をもたらす。

【0010】さらに、本発明において、該細胞系にpM1T-9及びGD3シンターゼcDNAをco-transfectした場合にGM1と同様GD1bも発現することを見出した。さらに、pM1T-9の、あらかじめGM2/GD2シンターゼ遺伝子を遺伝子導入したL細胞株(GM3シンターゼ欠失)への導入は、アシアロ-GM1(asialo-GM1)を発現することを見出した。上記本発明における知見によれば、酵素分析により示唆されたように、GD1b/GM1/GA1シンターゼが同一であることを確認するものである。

【0011】さらに、本発明においては、 $\beta$ 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子の、ラット組織からの全RNAを用いたノーザンブロットにおいて、1.6kb mRNAが、脾臓、胸腺、腎臓、および精巣において強く発現する\*

(核酸)

DNA デオキシリボ核酸

cDNA 相補的DNA

RNA リボ核酸

＊れるという知見を得た。さらに、成体ラットの脳組織における遺伝子の発現レベルは特に高くない一方、該遺伝子は、胎生12日のラット胎仔脳においては高いレベルであり、出生とともにピークに達し、その後成体ラットの脳と同程度の低レベルへ落ちるという知見を得た。

【0012】すなわち、本発明は、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列のうち26位のSerから371位のSerまでのアミノ酸配列、又は前記アミノ酸配列に対して1以上、通常1ないし数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を含んでなる、 $\beta$ 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ活性を有する糖転移酵素を提供するものである。

【0013】また、本発明は、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列のうち1位のMetから371位のSerまでのアミノ酸配列、又は前記アミノ酸配列に対して1以上、通常1ないし数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を含んでなる、 $\beta$ 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ活性を有する糖転移酵素を提供するものである。

【0014】さらに、上記記載の糖転移酵素をコードするポリヌクレオチドを提供するものである。

【0015】また、本発明は、配列表の配列番号2に記載の塩基配列のうち270位のTから1307位のTまでの塩基配列を有するポリヌクレオチドを提供するものである。

【0016】また、本発明は、配列表の配列番号2に記載の塩基配列のうち195位のAから1307位のTまでの塩基配列を有するポリヌクレオチドを提供するものである。

【0017】さらに、本発明は、配列表の配列番号2に記載の塩基配列とハイブリダイズし、かつ $\beta$ 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質(糖転移酵素)をコードするポリヌクレオチドを提供するものである。このようなハイブリダイズするDNA又はRNAは、好ましくは $\beta$ 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ活性を保持しているものであり、ストリンジェントな条件下、例えば50%ホルムアミド、5xSSC、10% Na-デキストラ、20mM Na-ホスフェート(pH6.5)、42°Cのハイブリダイゼーション条件下で前記ポリヌクレオチドとハイブリダイズするものである。

【0018】以下、本発明を実施の形態に即してより詳細に説明する。なお、本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などの略号で表示する場合、IUPAC-IUBによる略号あるいは当該分野における慣用の略号を使用した。

【0019】

mRNA メッセンジャーRNA

A アデニン

C シトシン

G グアニン

T チミン

(その他)

TLC thin layer chromatography

Trf transfectionまたはtransfectant

$\beta$ -1,4 GalNAc-T  $\beta$ 1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase

$\beta$ -1,3 Gal-T  $\beta$ 1,3-galactosyltransferase

$\alpha$ 2,8S-T  $\alpha$ 2,8 sialyltransferase

CMP-NeuAc cytosine monophosphate-N-acetylneuraminic acid

UDP-GalNAc uridine diphosphate-N-acetylgalactosamine

UDP-Gal uridine diphosphate galactose

CT-B cholera toxin B

Et.Br. Ethyidium bromide

【0020】

【発明の実施の形態】

#### 材料及び方法

(細胞及び抗体) マウス細胞株KF4Cは、KF3027(Nagata, 20 Y., Yamashiro, S., Yodoi, J., Lloyd, K. O., Shiku, H., and Furukawa, K. (1992) J. Biol. Chem. 267, 12082-12089)のプラスミドpMIK-Hyg/M2T1-1 (pMIK/HygベクターにGM2/GD2シンターゼcDNAをインサートしたもの)の安定な遺伝子導入体である。B78-2は、B78 (B16のサブライン)へのpM2T1-1の安定な遺伝子導入体である(Nagata, Y., Yamashiro, S., Yodoi, J., Lloyd, K. O., Shiku, H., and Furukawa, K. (1992) J. Biol. Chem. 267, 12082-12089)。これらの細胞は、ハイグロマイシン(hygromycin, 250  $\mu$ g/ml) (Calbiochem-Novabiochem, ラホヤ, CA) 添加又は無添加のDulbecco改良イーグル最小必要培地(D-MEM)7.5%牛胎児血清(FCS)及び300  $\mu$ g/mlのG418(Sigma, セントルイス, Mo) 中で保持できる。

【0021】 L1-17は、GM2/GD2シンターゼcDNAクローンの遺伝子導入L細胞である。すなわちpCDM8(Nagata, Y., Yamashiro, S., Yodoi, J., Lloyd, K. O., Shiku, H., and Furukawa, K. (1992) J. Biol. Chem. 267, 12082-12089)に組込まれたpM2T1-1と、pSV2neoの遺伝子導入体であり、アシアロ-GM2発現性である。GD1bと特異的に反応するモノクローナル抗体(mAb370)及び、抗アシアロ-GM1モノクローナル抗体(mAb229)は本発明者等により以下のように作製可能である。

【0022】 すなわち、リボソームにそれぞれのガングリオシドを組込んでAKRマウスに2週間隔で免疫後、その脾臓細胞をNS-1ミエローマ細胞と融合する。HAT培地で選択後、培養上清を用いてガングリオシドに対するELISAを行い、特異的抗体をピックアップする。

【0023】 (プラスミド及びcDNAライブラリー) ラット脳cDNAライブラリーはpoly(A)<sup>+</sup>RNAと、pcDNAI発現ベクター(Invitrogen, サンジエゴ, CA)を用いて作製可能 50

である。このライブラリーは、 $3.5 \times 10^6$ 個以上の独立したコロニーを含んでいるものが好ましい。

【0024】 宿種バクテリアとしてはE.Coli MC1061/P3を使用可能である。

【0025】 プラスミドpMIK/D3T-31は、GD3シンターゼcDNAクローンであるpD3T-31(Haraguchi, M., Yamashiro, S., Yamamoto, A., Furukawa, K., Takamiya, K., Lloyd, K. O., Shiku, H., and Furukawa, K. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 10455-10459)のXhoIフラグメントを、pMIK/Neo発現ベクター(東京医科歯科大学、丸山博士より提供。新細胞工学実験プロトコル、「発現プラスミドの構築」254-259ページ、東京大学医科学研究所編、秀潤社、1993年)へインサートして作製することが可能である。

【0026】 ( $\beta$ 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼのcDNAクローンの単離) cDNAライブラリーのプラスミドは従来方法に基づき(Davis, L. G., Dibner, M. D., and Battey, J. F. (1986) Methods in Molecular Biology, Elsevier Science. 285-289)、一度増殖し、プラスミドpMIK/D3T-31と共にDEAEデキストラン (Pharmacia Biotech, Uppsala)を用いてKF4C細胞へ遺伝子導入することが可能である。

【0027】 例えば、10cm皿(Corning, Corning, NY)のサブコンフルエントKF4C細胞 $1.5 \times 10^6$ 個に、8  $\mu$ gずつのcDNAライブラリープラスミド及びpMIK/D3T-31を共-遺伝子導入することで可能である。さらに、60分後、10% DMSO/PBSにて2分間処理した後、2日間培養し、遺伝子導入した細胞をプレートから剥がし、1:200希釈でmAb370と氷上45分間インキュベートする。細胞をヤギ抗マウスIgM(Cappel, Durham, NC)でコートした皿に移す(Wysoki, L. J., and Sato, V. L. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 2844-2848)。プラスミドDNAは、パンニングされた細胞から、Hirt抽出液を作製することにより採りだし可能であり、MC1061/P3へ形質転換するこ

とが可能である。拡張したプラスミドDNAを再度遺伝子導入し、同じ操作を繰返す(例えば4回)。その後、それぞれ30コロニーを含む96群を調製し、mAb370結合活性の発現によりスクリーニングすることが可能となる。いくつかの陽性群(例えば2つ)から適当数(例えば17)のクローンをスクリーニングし、KF4C上でGD1bを発現する単一コロニー(例えば3つ)をミクロスケールDEAEデキストラン遺伝子導入及び免疫蛍光(IF)アッセイを用いて単離することが可能である。

【0028】(DNAシーケンス)単離したcDNAプラスミドはXhoI及びHindIIIで消化し、ファージミドブルースク립ト(pBSK)KS(+)ベクターにクローニングすることが可能である。このクローンの欠失変異体は、例えば、Kilo-Sequence欠失キット(Takara, Kyoto)により調製できる。

【0029】ダイデオキシヌクレオチドターミネション塩基配列決定方法としては、T3/T7ダイプライマー又は、4種類の追加のカスタムプライマーとPRISMダイターミネーターサイクルシーケンスキットを用いて、モデル377DNAシーケンサー(Applied Biosystems, Foster City, CA)により行うことが可能である。

【0030】( $\beta$ 1,3Gal-T遺伝子)マウスメラノーマ細胞株、KF-4C及びGM2発現細胞株78-2を、トランジェント及び安定な発現システムのための受容細胞として用いることが可能である。

【0031】GM1のトランジェントな発現のために、pMIT-9/cDNAIベクターをKF-4CへDEAE-デキストランにより遺伝子導入する。

【0032】GD1bのトランジェント発現のために、KF-4CへpMIK-neo/D3T-31とpMIT-9/cDNAIとをco-transfectする。

【0033】GA1のトランジェント発現のために、GA2発現L1-17細胞に、pMIT-9/cDNAIを遺伝子導入する。これらのガングリオシドの発現は例えば、IFアッセイとフローサイトメトリーにより検出可能である。

——【0034】GM1とGD1b発現の安定遺伝子導入体調製のために、pMIT-9/cDNAI及びpMIK-Hyg/D3T-31を、例えばリン酸カルシウム沈殿法(Davis, L. G., Digner, M. D., and Battey, J. F. (1986) *Methods in Molecular Biology*, Elsevier Science, 290-292)によりB78-2にco-transfection可能である。遺伝子導入体を選択するため、細胞は、G418(300 $\mu$ g/ml)及びハイグロマイシン(250 $\mu$ g/ml)を含むD-MEM/7.5%FCS中で培養する。これらの安定遺伝子導入体のガングリオシドの発現はIFアッセイ及びフローサイトメトリーにより行う。

【0035】(フローサイトメトリー分析)ガングリオシド発現はマウスmAb370(抗GD1b)、mAb229(抗GA1)及びFITC結合コレラトキシンBサブユニット(List Biological Laboratories, Campbell, CA)(GM1)を用いて行う。具体的には、mAbs370及び229では細胞をmAbsと45分間氷上で

インキュベートし、FITC結合ウサギ抗マウスIgMと氷上45分間、染色する。

【0036】また、細胞表面のGM1を分析するため、細胞はFITC結合コレラトキシンBサブユニットと45分間インキュベートし、FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA)上でフローサイトメトリーにより分析する。染色の強度は具体的には蛍光強度の対数として任意単位で測定され、4桁スケールで表示する。

【0037】フローサイトメトリーのコントロール細胞としては、例えばGD1bとGA1に関しては2次抗体のみ用いて調整することが可能である。GM1発現のためには、ベクターのみの遺伝子導入細胞をFITC結合コレラトキシンBサブユニットで染色して用いる。

【0038】(RNA単離及びノーザンブロット)RNAは成体ラット組織及び胎仔ラット脳から、酸フェノールを用いて抽出可能である(Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987) *Anal. Biochem.* 162, 156-159)。具体的には、全RNA(20 $\mu$ g)を1.2%アガロース-ホルムアルデヒドゲル上で分離し、GeneScreenPlus膜(Dupont, Boston, MA)上へ移す。 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -dCTP標識ラット $\beta$ 1,3Gal-T cDNA(pMIT-9)、又は $\beta$ アクチンcDNA(ヌクレオチド69-814)プローブとのハイブリダイズは公知の条件(Nagata, Y., Yamashiro, S., Yodoi, J., Lloyd, K. O., Shiku, H., and Furukawa, K. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 12082-12089)で可能であり、分析は、BAS2000Bio-Imaging分析機(Fuji film, Tokyo)等の使用により可能である。

【0039】(糖脂質の抽出及び薄層クロマトグラフィ(TLC)免疫染色) $\beta$ 1,3Gal-T遺伝子の安定遺伝子導入体は、B78-2メラノーマへのクローン化プラスミド及びpMIK-Hyg/D3T-31( $\alpha$ 2,8シアリルトランスフェラーゼ( $\alpha$ 2,8S-T)cDNA)の、リン酸カルシウム沈殿によるco-transfectionにより得られる。G418とハイグロマイシン耐性クローンのうち、GD1b発現クローンを、IFアッセイ及びフローサイトメトリーの結果に基づいて選択することが可能である。糖脂質は従来の方法により単離可能である(Furukawa, K., Clausen, H., Hakomori, S., Sakamoto, J., Look, K., Lundblad, A., Mattes, M. J., and Lloyd, K. O. (1985) *Biochemistry*, 24, 7820-7826)。具体的には、約300 $\mu$ lの遺伝子導入細胞のバックされた細胞塊と、Hyg遺伝子のみを含むコントロールクローンから、クロロホルム/メタノール(2:1,1:1,1:2)で順に抽出できる。脱塩後、ガングリオシドはDEAEセファデックスA-50(Pharmacia LKB)イオン交換クロマトグラフィにより分離できる。TLCは、具体的には高精度TLCプレート(Merck, Darmstadt)により、クロロホルム/メタノール/2.5N NH<sub>4</sub>OH(60:35:8)を用いて行いうる。成分はレゾルシノールを噴霧して可視化できうる。新規合成ガングリオシドは、アルミニウム板上のシリカゲルプレート(Merck)によりTLC免疫染色が可能である(Furukawa, K., Clausen, H., Hakomori, S., Sakamoto, J., Look, K., Lundb

lad, A., Mattes, M. J., and Lloyd, K. O. (1985) *Biochemistry*, 24, 7820-7826). TLC後、プレートを乾燥し、ポリビニリデンジフルオリド(PVDF)膜上に移す。プレートは非特異的吸着をブロックするため1%ウシ血清アルブミンを含むリン酸緩衝液/食塩水中で1時間インキュベートした後、mAbsと1時間室温でインキュベートし、さらにビオチン化ウサギ抗マウスIgG及びアビジン-ビオチン複合体とインキュベートする。この目的で例えばVectastain ABC-POキット (Vector laboratories, CA)を使用可能である。

【0040】(酵素アッセイ)  $\beta$ 1,3Gal-Tは、公知の方法で測定できる(Ruan, S., and Lloyd, K. O. (1992) *Cancer Res.* 52, 5725-5731)。具体的には、膜分画を調製するために、サンプルを窒素空洞化装置を用いて溶解する。核は低速遠心で除去し、上清を105,000gで1時間4°Cで遠心する。

【0041】 $\beta$ 1,3Gal-Tの酵素活性を分析するには、具体的には反応混合物は次の成分を50 $\mu$ lに含むものである。150mM MnCl<sub>2</sub>、0.375% TritonCF-54(Sigma)、UPD- [<sup>14</sup>C] Gal (2.0x10<sup>5</sup>dpm) (NEN, Boston, MA)、及び100  $\mu$ gのタンパク質を含む膜分画である。これを2時間37°Cでインキュベートした後、生成物はC18Sep-Packカートリッジ(Waters, Milford, MA)で単離し、さらにTLC及びフルオログラフィ(Yamashiro, S., Ruan, S., Furukawa, K., Tai, T., Lloyd, K. O., Shiku, H., and Furukawa, K. (1993) *Cancer Res.* 53, 5395-5400)で分析する。

【0042】(ホモロジー検索)ヌクレオチド及びアミノ酸配列ホモロジー検索は、インターネットプログラムBLAST(National Center for Biotechnology Information)を用いて行うことが可能である。またアミノ酸配列と疎水/親水性分析は、ソフトウェアGENTYX-MACver6.1.0 (Software Development, Tokyo)で行うことができる。

【0043】

【実施例】(GD1bシンターゼcDNAの発現クローニングの方法) GD1bシンターゼ遺伝子のcDNAクローンを単離するために、 $\beta$ 1,4-N-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ( $\beta$ 1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase,  $\beta$ 1,4GalNAc-T) cDNAであるpM2T1-1のKF3027への遺伝子導入体を調製して、GM2発現の新規細胞株を得、この株をKF4Cと命名した。図1に示されるように $\alpha$ 2、8S-T cDNA、pD3T-31及びライブラリーに含まれる $\beta$ 1、3Gal-T cDNAのco-transfectionの後、GD1bの発現が可能となる。

【0044】(GD1bシンターゼ遺伝子のcDNAクローンの単離) cDNAライブラリーの遺伝子導入と、抗GD1b mAb370によるパニング及びHirt抽出を5サイクルの後、pM1T-9というcDNAクローンが単離された。pM1T-9のpD3T-31とKF4Cへのco-transfectionの後、GD1bの新規発現が図2 Bに示されるように観察された。これらのトランジェン

ト遺伝子導入細胞において、図2 Aに示すようにFITC結合コレラトキシンBにより染色した際、GM1もまた新しく発現された。

【0045】従って、GD1bシンターゼとGM1シンターゼは同一であり、単一の遺伝子によりコードされていることが強く示唆される(Iber, H., Kaufmann, R., Pohlentz, G., Schwarzmann, G., and Sandhoff, K. (1989) *FEBS Lett.* 248, 18-22)。さらに確認するために、KF4CにpM1T-9のみを遺伝子導入し、GD1bとGM1の発現を調べた。これらの遺伝子導入体はGM1は発現したがGD1bはしなかった。このことは想定されているガングリオシド合成経路(Iber, H., Kaufmann, R., Pohlentz, G., Schwarzmann, G., and Sandhoff, K. (1989) *FEBS Lett.* 248, 18-22)と一致するものである。さらに、この酵素は、アジアロ-GM2(GA2)からアジアロ-GM1(GA1)の合成を触媒するGA1シンターゼと同一であると考えられてきた。そこで、このcDNAの遺伝子導入によるGA1の合成の有無を調べるために、pM2T1-1により遺伝子導入されたL細胞を、pM1T-9の受容細胞として用いた。L細胞は、GM3シンターゼ活性(Yamashiro, S., Haraguchi, M., Furukawa, K., Takamiya, K., Yamamoto, A., Nagata, Y., Lloyd, K. O., Shiku, H., and Furukawa, K. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 6149-6155)を欠いているために、すべての複合型ガングリオシドを欠いている。図2に示すように、pM2T1-1(安定)とpM1T-9(トランジェント)によるL細胞への遺伝子導入は、GA1特異的mAb229により検出されるように明確にGA1を発現した。

【0046】( $\beta$ 1,3Gal-T活性及びその生成物の確認)本発明により、B78-2(pM2T1-1によるB78の遺伝子導入細胞株)を用いて、pM1T-9又はpM1T-9とpMIK/D3T-31の安定な遺伝子導入細胞を確立した。フローサイトメトリーはGM1(図3 B)又はGM1/GD1b(図3 D)の新規なそして有意な合成レベルを示した。親細胞(B78/M2T1-1)、及び二重の遺伝子導入体(B78/M2T1-1/M1T-9/D3T-31)から抽出されたグリコスフィンゴリピド(glycosphingolipid)がTLCにより分析され、糖脂質成分の変換が予想の通り見出された(図4)。また、二重遺伝子導入細胞中に、特異的GD1bバンドがTLC-免疫染色により示された。この結果より、クローン化されたcDNA pM1T-9は、GD1b/GM1/GA1シンターゼ遺伝子から由来するということが示された。

【0047】(pM1T-9のインサートの配列)図5に、該クローンのHindIIIとXhoIサイト間のHindIII-XhoIフラグメントを有するpBSKを構築しその塩基配列分析により決定されたpM1T-9のインサートの全配列を示した(配列表の配列番号2参照)。これまで単離された他のグリコシルトランスフェラーゼcDNAと比較して、このcDNAは相対的に小さいサイズであり、全サイズは1613bpである。194bpの5'-非翻訳領域と、1113bpの連続オープンリーディングフレームと、306bpの3'-非翻訳領域で成ってい

る。単一のポリアデニル化シグナルと、70以上のポリアデニル化領域が存在する。

【0048】オープンリーディングフレームの最初にある開始コдонはKozak共通開始配列(Kozak, M. (1986) *Cell*. 44, 283-292)と似た配列内に埋め込まれている。このオープンリーディングフレームは、分子量40,976.1ダルトンの371のアミノ酸からなるタンパク質を予想させる(配列表の配列番号1参照)。最近の利用可能なタンパク質及び核酸データベースの検索によっても、該cDNAと有意のホモロジーを有する他の遺伝子は見出されなかった。4つの他のガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子、即ち $\alpha 1$ 、3Gal-T(Joziasse, D. H., Shaper, J. H., Van den Eijnden, D. H., Van Tunen, A. J., and Shaper, N. L. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 14290-14297)、 $\beta 1,4$ Gal-T(Narimatsu, H., Sinha, S., Brew, K., Okayama, H., and Qasba, P.K. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 4720-4724)、GalCer-Gal-T(Schulte, S., and Stoffel, W. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 10265-10269; Stahl, N., Jurevics, H., Morell, P., Suzuki, K., and Popko, B. (1994) *J. Neurosci. Res.* 38, 234-242)及び血液型Bシンターゼ $\alpha 1$ 、3Gal-T(Yamamoto, F., Marken, J., Tsuji, T., White, T., Clausen, H., and Hakomori, S. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 1146-1151)でさえ、わずか10-16%程度のアミノ酸配列におけるホモロジーを示すだけであった。

【0049】予想されるアミノ酸配列の検索及びハイドロパシー解析は、このタンパク質が今まで知られたグリコシルトランスフェラーゼと同様の構造上の特徴を有することを示唆している。アミノ末端近傍に単一の疎水のセグメントがあり、これは21のアミノ酸からなる。この推定されるシグナルアンカー配列はサイトゾル内に4残基を配置し、346アミノ酸をゴルジ体内腔に触媒領域として配置すると考えられる。予想されるアミノ酸配列は、単一のN-グリコシル化部位が143位-145位に存在し、プロリン豊富領域が42位-71位(11/30)に存在することを示す。以上の結果から、該酵素活性発現に必要な最小部位は、細胞膜貫通部位と細胞質領域を除く、26位のアミノ酸から末端の371位までである。

【0050】( $\beta 1,3$ Gal-TcDNAの産物はガラクトースをGD2、GM2及びGA2に転移する) pM1T-9のトランジェント及び安定遺伝子導入の結果により、この遺伝子は、3つの構造、すなわちGD1b、GM1およびGA1の合成を触媒する単一の $\beta 1,3$ Gal-Tをコードするものであることが強く示唆された。

【0051】安定な遺伝子導入細胞のメンブレンフラクションの酵素活性を調べた。図6Aに示すように、B78のpMIK/M1T-9及びpD3T-31による安定遺伝子導入体からのメンブレンフラクションは、20,000units(pmol/h/mgタンパク質)のGM1シンターゼ活性を示し、一方アクセ

プターを加えない場合は、有意の生成物が検出されなかった。予想されるように、pMIKベクター自体による遺伝子導入体はほぼゼロ活性であった。GD2、GA2、GlcCer、GD1b、GM3及びGD1aを基質として調べた場合、GD2とGA2はUDP-Galの有意の取込レベルを示した(図6B)。

【0052】(ノーザンブロット分析)種々のラット組織において $\beta 1,3$ Gal-T遺伝子の発現レベルを全RNAを用いてノーザンブロットにより調べた。種々の組織のうち、腎臓、精巣、脾臓及び胸腺が相対的に高いレベルの発現を示し、また一方調べたほぼ全ての組織がある程度のレベルの遺伝子転写物を含んでいた(図7A)。

【0053】成体ラットの脳組織での遺伝子発現は高くなかった。すなわち、遺伝子発現を、ラット脳の成長段階で分析した結果、該遺伝子はすでに12日胎仔脳に検出され、生まれるまでは高レベルで維持されたが(図7Bおよび図8)、成体ラット脳では発現レベルは低く維持される。

【0054】

【発明の効果】本発明により、GD1/GM1/GA1シンターゼ遺伝子の同一性が示される。すなわち、GD1bシンターゼcDNAを単離し、その遺伝子産物が、GalNAc $\beta 1 \rightarrow 4$ Gal-、GalNAc $\beta 1 \rightarrow 4$ (NeuAc $\alpha 2 \rightarrow 3$ )Gal-又はGalNAc $\beta 1 \rightarrow 4$ (NeuAc $\alpha 2 \rightarrow 8$ NeuAc $\alpha 2 \rightarrow 3$ )Gal-のいずれの末端配列を有する糖脂質をもアクセプターとして使うことを示すものである。

【0055】GM2/GD2シンターゼ(Yamashiro, S., Haraguchi, M., Furukawa, K., Takamiya, K., Yamamoto, A., Nagata, Y., Lloyd, K. O., Shiku, H., and Furukawa, K. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 6149-6155)の基質特異性分析の場合、GA2合成は相対的に低いものであるが、これと比較して、本発明に基づき、 $\beta 1,3$ Gal-Tの、GM2、GD2、GA2に対するアクセプター活性はそれほど異ならないことが示唆された(図6B)。

【0056】さらに本発明に基づき、係るガングリオシドの生理学的重要性はそれらのグリコシルトランスフェラーゼ遺伝子の遺伝的改変により、より生理学的に研究され得ることとなる。すなわち、 $\beta 1,3$ Gal-T遺伝子の遺伝子操作により最終的には、GD1b/GM1/GA1より高級の複合型ガングリオシドの役割の解明を可能とするものである。

【0057】例えば、既に述べたように、ガングリオシドは脊椎動物の神経系の発達上、重要な役割をする分子であり、特にGM1はインビボ及びインビトロでその生理的効果が活発に研究されている。例えば毒物剤、神経外傷、虚血性損傷、変性疾患および機械的侵襲などによる障害に対する修復効果等である(Sabel, B. A., Slavin, M.D., and Stein, D. G. (1984) *Science*. 225, 340-342, Kapriak, S. E. (1984) *Adv. Exp. Med. Biol.* 174, 489-497, Svennerholm, L. (1994) *Life Sci.* 55, 2125-2134)。また、インビトロ培養系におけるGM1ガング



リオシドの添加は、神経細胞の神経突起の伸張を誘導又は亢進させる(Facci, L., Leon, A., Toffano, G., Sonnino, S., Ghidoni, R., and Tettamanti, G. (1984) J. Neurochem. 42, 299-305)。実際、複合ガングリオシドを欠く $\beta 1, 4\text{GalNAc-T}$ 遺伝子の破壊されたマウスは、神経伝達速度の減少(Takamiya, K., Yamamoto, A., Furukawa, K., Yamashiro, S., Shin, M., Okada, M., Furukawa, K., Haraguchi, M., Takeda, N., Fujimura, K., Sakae, M., Kishikawa, M., Shiku, H., Furukawa, K., and Aizawa, S. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 10662-10667)や行動異常等の明確な神経系の機能障害を示す。これらの効果に対応する生理学的機能の解明のため、本発明において見出された、ラット脳の発達段階\*

## 配列

Met Pro Leu Ser Leu Phe Arg Arg Leu Leu Leu Ala Val Leu Leu		
5	10	15
Leu Val Ile Ile Trp Thr Leu Phe Gly Pro Ser Gly Leu Gly Glu		
20	25	30
Glu Leu Leu Ser Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Pro Ala Pro Ala		
35	40	45
Ser Pro Gly Pro Pro Leu Ala Leu Pro Arg Leu Leu Ile Pro Asn		
50	55	60
Pro Gln Ala Cys Gly Gly Ser Gly Pro Pro Pro Phe Leu Leu Ile		
65	70	75
Leu Val Cys Thr Ala Pro Glu His Leu Asn Gln Arg Asn Ala Ile		
80	85	90
Arg Gly Ser Trp Gly Ala Ile Arg Glu Ala Arg Gly Phe Arg Val		
95	100	105
Gln Thr Leu Phe Leu Leu Gly Glu Pro Met Gly Gln Gln Phe Ala		
110	115	120
Asp Leu Ala Ser Glu Ser Ala Ala Gln Gly Asp Val Leu Gln Ala		
125	130	135
Ser Phe Gln Asp Ser Tyr Arg Asn Leu Thr Leu Lys Thr Leu Thr		
140	145	150
Gly Leu Asn Trp Val Asn Lys Tyr Cys Pro Met Ala Arg Tyr Ile		
155	160	165
Leu Lys Thr Asp Asp Asp Val Tyr Val Asn Val Pro Glu Leu Val		
170	175	180
Ser Glu Leu Ile Gln Arg Gly Gly Pro Ser Glu Gln Trp Gln Lys		
185	190	195
Gly Lys Glu Pro Gln Glu Glu Thr Thr Ala Val His Lys Glu His		
200	205	210
Lys Gly Gln Ala Val Pro Leu Leu Tyr Leu Gly Arg Val His Trp		
215	220	225
Arg Val Arg Pro Thr Arg Thr Pro Glu Ser Arg His His Val Ser		
230	235	240
Glu Glu Leu Trp Pro Glu Asn Trp Gly Pro Phe Pro Pro Tyr Ala		
245	250	255
Ser Gly Thr Gly Tyr Val Leu Ser Ile Ser Ala Val Gln Leu Ile		
260	265	270

\*階にのみ見られる $\beta 1, 3\text{Gal-T}$ 遺伝子の高い発現は、脳組織の分化におけるガングリオシド生成物の重要な役割を示唆するものであり、ガングリオシドやその合成酵素遺伝子の治療方法、治療薬への応用を可能とするものである。

【0058】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 371

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 蛋白質

15

16

Leu Lys Val Ala Ser Arg Ala Pro Tyr Leu Pro Leu Glu Asp Val		
275	280	285
Phe Val Gly Val Ser Ala Arg Arg Val Gly Leu Ala Pro Thr His		
290	295	300
Cys Val Lys Leu Ala Gly Ala Thr His Tyr Pro Leu Asp Arg Cys		
305	310	315
Cys Tyr Gly Lys Phe Leu Leu Thr Ser His Lys Val Asp Pro Trp		
320	325	330
Lys Met Gln Glu Ala Trp Lys Leu Val Arg Gly Leu Asn Gly Arg		
335	340	345
Arg Thr Glu Pro Phe Cys Ser Trp Leu Gln Gly Phe Leu Gly Thr		
350	355	360
Leu Arg Cys Arg Phe Ile Ala Trp Leu Asn Ser		
365	370	

配列番号 : 2

配列の長さ : 1613

配列の型 : 核酸

\*鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

\* 配列の種類 : DNA

配列

```

GGCGAGGGGA ACCAAGCTGT CCCCAGGGCC GGCTGCGGTG GGTCGGGACC GGAGTGCATG 60
AGACTGACTG CATCTCATGA TGCTACCGGG CCCGTGCATG GCTCACCCTG TCTCTGCTGC 120
AGCAGCTGGT TAGGGCCGCT CTCGAGCTC CCAGCGCTCT TAACAGCTCT GCCACAGGT 180
CTCTGCGGCT CACC ATG CCC CTC AGC CTC TTC CGG CGC CTC CTT CTG GCG 230
GTC CTA CTA CTG GTG ATC ATC TGG ACA CTG TTT GGA CCA TCG GGT 275
TTG GGG GAG GAG CTG CTG AGC CTG TCC CTG GCG TCC CTT CTG CCA 320
GCC CCA GCC TCG CCA GGA CCA CCC CTG GCC CTG CCC CGC CTC TTG 365
ATT CCT AAC CCC CAG GCC TGT GGT GGC TCC GGA CCC CCT CCT TTC 410
TTG CTC ATC CTG GTG TGT ACG GCC CCG GAG CAC CTG AAC CAG AGA 455
AAC GCC ATT CGG GGA TCT TGG GGC GCC ATT CGC GAG GCC CGC GGT 500
TTC AGG GTG CAG ACG CTC TTC CTC CTG GGA GAA CCT ATG GGA CAG 545
CAG TTT GCT GAC CTG GCC TCA GAG TCA GCA GCA CAG GGG GAT GTC 590
TTG CAG GCC TCC TTC CAG GAT TCC TAC CGC AAC CTC ACC CTC AAG 635
ACC CTC ACC GGA CTG AAC TGG GTG AAC AAA TAC TGT CCT ATG GCC 680
CGG TAC ATC CTC AAG ACA GAT GAT GAC GTG TAT GTC AAT GTC CCA 725
GAG CTG GTG TCA GAA CTG ATA CAG AGA GGG GGG CCT TCA GAG CAA 770
TGG CAG AAG GGC AAA GAG CCA CAG GAA GAG ACA ACA GCT GTC CAC 815
AAA GAG CAC AAA GGC CAG GCA GTG CCC CTT CTG TAT TTA GGC CGG 860
GTG CAC TGG AGG GTG AGG CCC ACT CGA ACA CCA GAG TCC CGG CAT 905
CAC GTG TCA GAA GAA CTG TGG CCA GAA AAC TGG GGT CCT TTC CCA 950
CCC TAC GCC TCT GGC ACG GGG TAT GTA TTG TCT ATC TCT GCT GTG 995
CAG CTC ATT CTG AAG GTG GCC AGC CGG GCC CCA TAT CTA CCT CTG 1040
GAG GAT GTC TTT GTG GGA GTA AGC GCA AGG CGA GTG GGC CTT GCC 1085
CCC ACA CAC TGT GTC AAG TTG GCT GGT GCT ACC CAC TAC CCA CTG 1130
GAT AGG TGC TGT TAC GGG AAG TTC CTG CTG ACG TCC CAC AAG GTG 1175
GAT CCT TGG AAA ATG CAG GAA GCC TGG AAG CTG GTG AGA GGA CTG 1220
AAT GGG AGA AGG ACT GAG CCC TTT TGT TCC TGG CTC CAG GGA TTT 1265
CTG GGT ACC TTG AGG TGC CGG TTC ATA GCC TGG CTC AAT AGT 1307
TGAGAGCCTG GGGCCACAGA AAACAAGACA GCACCTCAGG AACTTTTGCC 1357
CCAAAATCAG TGCCCAGGCT GCAGCTCCCC GTGGTGATCT ATTTCCCCAC 1407
AGCAGACTCT GAAGCTGCTA CTGACCAAGG ATAGATAGGG GGCTTGGGGC 1457
CTGGCCTGCC ATCTCCAAAG ACCAGGGAGG GACGAAGCAC AGGGTGTGGG 1507

```

17

GAAGACTCAA GAGCCCAATA AACACGTCTC TCTACAAAAA AAAAAAAAAA  
 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA  
 AAAAAA

18

1557  
 1607  
 1613

# 【図面の簡単な説明】

【図 1】図 1 は、 $\beta$ 1,3Gal-T の抗 GD1b mAb を用いた cDNA クローニングを示す図であり、KF4C は polyomaT 抗原と  $\beta$ 1,4GalNAc-T 遺伝子を導入されており、 $\alpha$ 2,8 シアル酸転移酵素と  $\beta$ 1,3Gal 転移酵素の cDNA が共に発現すると、GD1b が発現し得ることを示す図である。

【図 2】図 2 は、B78-2 及び L1-17 において新規ガングリオシドのトランジェント発現を示す図である。クローン化された cDNA pM1T-9 は、GD3 シンターゼ cDNA、pD3T-31 あり（右）またはなし（左）の条件で DEAE-デキストラン法により遺伝子導入した。GM1, GD1b および GA1 は 60 時間後、フローサイトメトリーにより特異的プローブを用いて分析した。細線は特異的プローブありの条件での結果を示し、実線はコントロールを示す。

【図 3】図 3 は、安定遺伝子導入細胞での GM1/GD1b の発現を示す図である。B78-2 細胞は、pM1T-9 のみ（左）または pM1T-9 と pD3T-31（右）により遺伝子導入された。GM1 は A および B ともに発現し、一方 GD1b は D にのみ発現した。細線は mAbs 添加サンプルを、また実線は二次抗体のみで処理したものを示す。

【図 4】図 4 は、安定遺伝子導入細胞から抽出されたガングリオシドの TLC の結果を示す図である。

A：レーン 1 及び 2 は B78 から、レーン 3 は B78-2、レーン 4 は B78-2/M1T-9/D3T-31 からの抽出したものである。レーン 1 は、10mg のウェット組織から、レーン 2～4 は 5mg のウェット組織からのガングリオシドである。標準は、ウシ脳からのガングリオシドである。使用溶媒は、クロロホルム/メタノール/2.5N  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (60:35:8) である。レゾルシノール噴霧をバンド検出に使用する。

B：ガングリオシドフラクションの TLC-免疫染色。レーン 3 および 4 は A と同様に調製した後、PVDF 膜にプロットし、抗 GD1b mAb370 により染色した（発色には ABC キットを用いた）。

【図 5】図 5 は、クローン化  $\beta$ 1,3Gal-T pM1T-9 の核酸

配列を示す図である。

上：単一のオープンリーディングフレームに対する演繹されたアミノ酸配列を塩基配列に加えて示す図である。21 アミノ酸を有する推定トランスメンブラン領域は二重線で示す。N-グリコシル化の可能性部位が下線で示される。ポリアデニル化シグナルが四角でかこまれる。

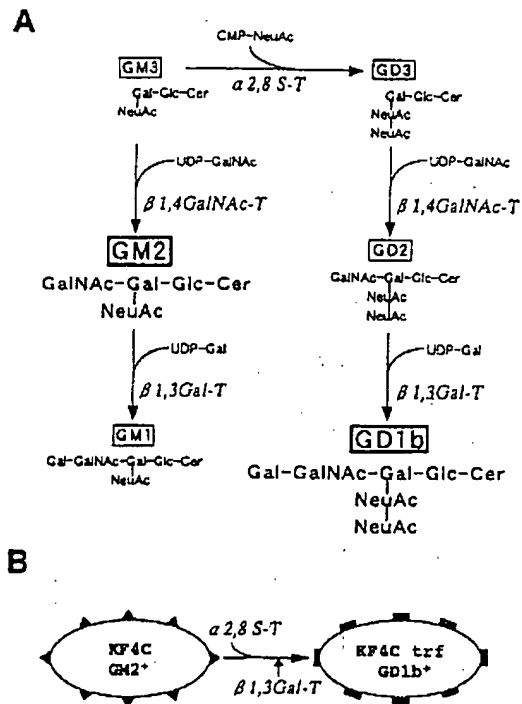
下：コード領域の演繹されたアミノ酸配列に対する、Kyte, Doolittle (Kyte, J., and Doolittle, R. F. (1982) J. Mol. Biol. 157, 105-132) に基づくハイドロパシ分析を示す図である。

【図 6】図 6 は、cDNA の安定遺伝子導入体からの抽出物の  $\beta$ 1,3Gal-T 活性を示す図である。ここで A は、GM2 アクセプターを用いた場合の酵素活性 (UPD- [ $^{14}\text{C}$ ] -Galactose をドナーとして用いる) を示す。メンブランフラクションが親株 B78-2 と B78-2/M1T-9/D3T-31 から調製され、酵素活性が GM2 をアクセプターとして用いて決定された。GM1 バンドが生成物の TLC で観測された。B は、種々のアクセプター構造に対する相対的  $\beta$ 1,3Gal-T 活性。GM2 アクセプターの場合を 100% とした。

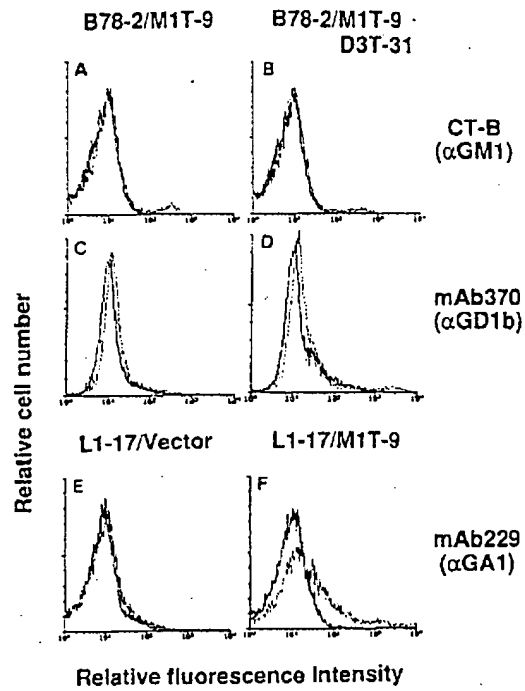
【図 7】図 7 は、 $\beta$ 1,3Gal-T 遺伝子のノーザンプロットの結果を示す写真である。A は、ラット各組織からの全 RNA 20  $\mu\text{g}$  をアガロースゲルで分離し、ナイロンメンブランにプロットする。pM1T-9 から調整した  $^{32}\text{P}$ -標識プローブとのハイブリダイズがなされたものである。B は、全ラット胎仔（レーン 1）、ラット胎仔脳（レーン 2～3）、またはラット脳（レーン 4）の RNA が分離され、A と同様にプロットされたものである。レーン 5 および 6 は脳からの RNA 30  $\mu\text{g}$  を用いたものである。

【図 8】図 8 は、図 7 で得られたバンド強度を、エチジウムブロミドで染色された 18SrRNA バンド（デンシトグラフ (Signal Analysis, Vienna, VA) にて測定）を用いて補正し、プロットした図である。繰返し実験の結果を  $\pm$ SD で表現した。

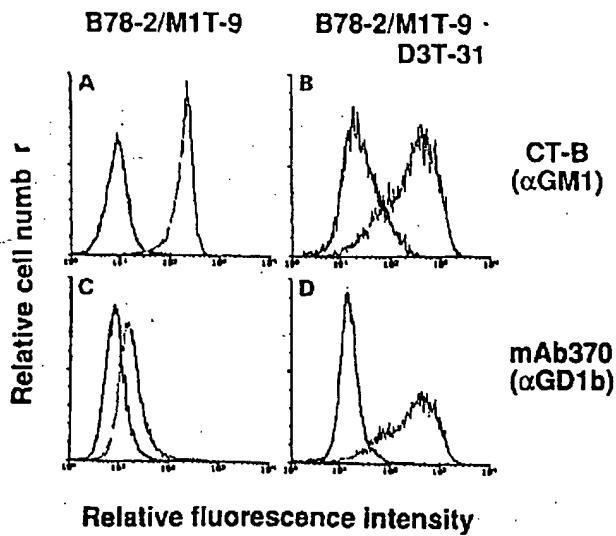
【図 1】



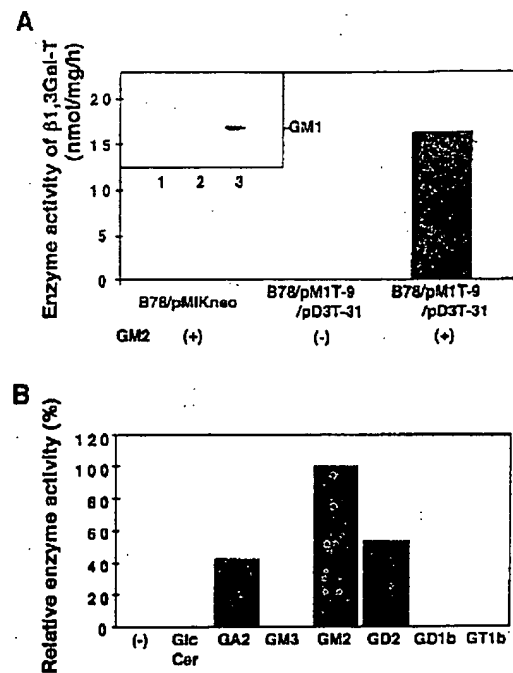
【図 2】



【図 3】

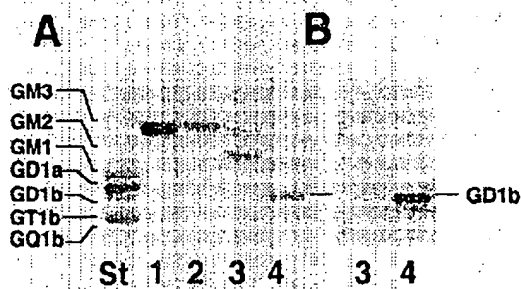


【図 6】



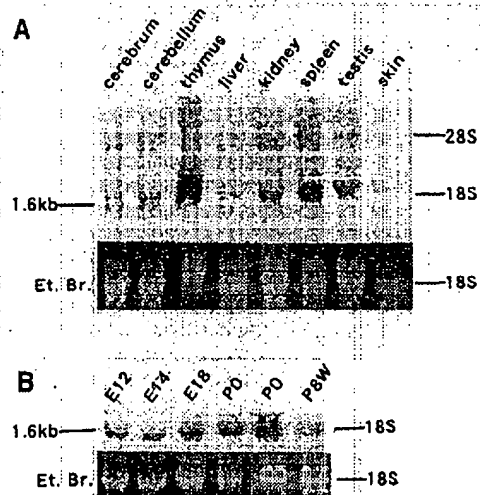
【図4】

図面代用写真



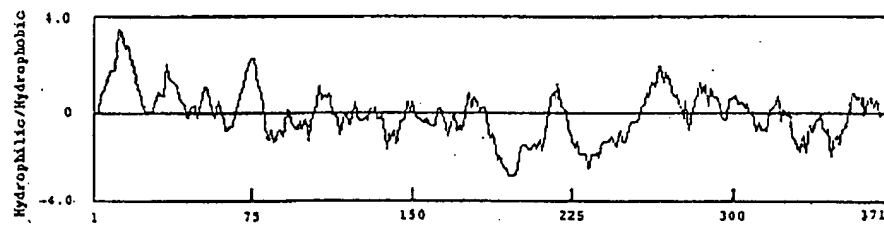
【図7】

図面代用写真

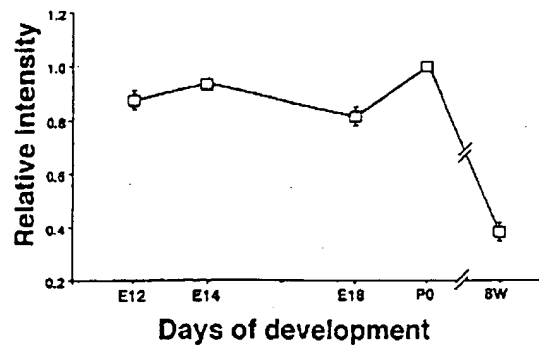


【図 5】

AGCTGTCTCCCGGGGCGGCTGCGGTGGGTGCGGACGGGAGTGGATGAGACTGACTGCTATCTGATGCTACCGGGCGCGTGCATGGCTC -194 GGGGAGGGGAACCA -181  
 ACCGCTGTCTGCTGCGACAGCTGGTTAGGACCGCTCTCGCAGCTCCCAAGCGTCTTAACAGCTCTGCGCCACAGCTCTCTCGCGCTGACC -91  
 ATGCGCCCTCAGCCCTCTCCCGGGGCGCTCTCTGCGGCTCTACTACTGGTGATCATCTGGACACTGTTTGGACCATCAGGTTTGGGGGAG 90  
 1 N P L S L F R R L L L A V L L L V I I W T L F G P S G L C E  
 GAGCTGCTGAGCTGTCTCTGGGCTCCCTTCTGCGAGCCCGAGCTCGCCAGGACACCGCTGGCGCTGCGCCCGCTCTTGATTCTAAC 180  
 31 E L L S L S L A S L L P A P A S P G P P L A L P R L L I P M  
 CCGCAGGCGCTGTGGTGGCTCGGACCCCTCTCTTCTGCTCATCTGGTGTGTACGGCCCGGAGCACCTGAACCCAGAGAAACCCATT 270  
 61 P Q A C G G S C P P P L L I L V C T A P E H L N Q R N A I  
 CGGGATCTTGGGGCCCATCTCGGAGGCGCGCGTTCAGGGTGACAGCGCTCTTCTCTGGGAGAAGCTATGGGACAGCAGTTTCT 360  
 91 R G S W G A I R S A R C F R V Q T L F L L G E P M G Q Q P A  
 GACCTGCGCTCAGAGTACGAGCAGAGGAGGATGCTTTCAGGCTCTCTTCAGGATCTCTACCGCAACCTCAGCCCTCAAGACCCCTCACC 450  
 121 D L A S E S A A Q G D V L Q A S F Q D S Y R N L T L K T L T  
 GGACTGAATGGGTGAACAAATACTGCTCTATGGCCCGGTACATCTCTAAGACAGATGATGAGTGATGTCAATGTCCAGAGCTGGTG 540  
 151 G L N W V N K Y C P M A R Y I L E T D D D V Y V N V P E L V  
 TCAGACTGATACAGAGAGGGGGCGCTTCAGAGCAATGGCAGAGGGCAAGAGCCACAGGAAGAGACAACAGCTGTCCACAAAGAGCAC 630  
 181 S E L I Q R G G P S E Q W Q K C K E P Q E Z T T A V B K E E  
 AAAGCCAGGCACTGCGCCCTTCTGTATTAGGCGGGGTGCACTGAGGGTGAGGCGCCACTCGAACACCAGAGTCCCGGCATCACGTGTCA 720  
 211 K G Q A V P L L Y L G R V H W R V R P T R T P E S R H H V S  
 GAAGAATGTGGTCAGAAACTGCGGTCTTTCCTACCTACCGCTCTGCGACGGGTATGTATTGTCTATCTCTCTCTGCGAGCTCAT 810  
 241 E E L W P E N W G P P P P P Y A S G T G Y V L S I S A V Q L I  
 CTGAAGGTGCGCAGCCCGGCGCCATATCTACTCTGAGGATGCTCTTGTGGAGTAAGCGCAAGCGCAGTGGGCGCTTSCCGCCACACAC 900  
 271 L K V A S R A P Y L P L E D V P V C V S A R R V G L A P T E  
 TGTGTCAATGTGGTGTGCTACCCACTACCCACTGGATAGGTGCTGTACGGGAAGTTCCTGCTGAAGTCCGACAAGGTGGATCTTGG 990  
 301 C V K L A G A T H Y P L D R C C Y G K F L L T S B K V D P W  
 AAAATGACAGAGGCTGGAAGCTGCTGACAGCACTGAATGGGACAAGGACTGAGCCCTTTCTCTCTGCTCCAGCGATTCTCGGTACC 1080  
 331 K M Q E A W K L V R G L N G R R T E P F C S W L Q G F L G T  
 TTCAGGTGCGCGCTCATAGCTGCGCTCAATAGTTCAGAGCTTGGGCGCCACAGAAAACAGACAGCAGCTCAGCAACTTTTGGCCCAAAAT 1170  
 361 L R C R F I A W L N S  
 CAGTCCCGACGCTGCACTCTCCCGTGGTGAATCTATTTCGCCACAGCAGACTCTGAAGCTGCTACTGACCAGGATAGATAGGGGGCTTGG 1260  
 GCGCTGCGCTGCCATCTCCAAAGACCAGGGAGGGACGAAAGCAGCGGTGTGGGGAAGACTCAAGAGCCCAATAAACACGCTCTCTCTACAA 1350  
 AA 1419



【図 8】



---

フロントページの続き

(72)発明者 岡田 雅彦  
長崎県西彼杵郡長与町嬉里郷1093-5-401

(72)発明者 古川 圭子  
三重県安芸郡河芸町大字影重2963-4 ト  
ミーハイム202号  
(72)発明者 古川 鋼一  
愛知県名古屋市北区名城3丁目1-5 名城住宅5-402